

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : **2 757 169**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **96 15344**

(51) Int Cl⁶ : C 07 K 19/00, C 12 N 15/62, 5/10, 15/38, C 12 P
21/02, A 61 K 48/00, 39/245

(12) **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

(22) Date de dépôt : 13.12.96.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 19.06.98 Bulletin 98/25.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE INSERM
ETABLISS PUBLIC A CARACT SCIENT ET TECH —
FR.

(72) Inventeur(s) : PRIEUR ERIC, LULE JACQUELINE,
DAVIGNON JEAN LUC et DAVRINCHE CHRISTIAN.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : REGIMBEAU.

(54) PROTEINE DE FUSION COMPORTANT TOUT OU PARTIE DE LA PROTEINE PP65 DE CMV HUMAIN, UTILE
NOTAMMENT DANS LA PREPARATION D'UN VACCIN.

(57) Protéine de fusion, caractérisée en ce qu'elle com-
porte au moins une partie de la protéine pp65 du cytomé-
galovirus (ou CMV), ou d'une protéine présentant au moins
80% d'homologie avec la protéine pp65, en association
avec au moins un second fragment peptidique dérivé du
CMV.

L'invention concerne également une séquence nucléoti-
dique codant pour une telle protéine, ou une composition
pharmaceutique les contenant. Elle se rapporte aussi à
l'utilisation à titre de médicament et à un procédé de prépa-
ration de la protéine.

FR 2 757 169 - A1



La présente invention se rapporte à de nouvelles associations de protéines, et à leur utilisation comme médicament. Plus particulièrement, elle concerne la mise au point de vaccins contre le CMV.

5 Le cytomégalo virus humain (CMV), un virus enveloppé à ADN double brin de 230 kpb est le plus gros de la famille des Herpès virus. Comme les autres membres de cette famille de virus, il est présent sous forme latente et peut subir des réactivations répétées conduisant à une virémie plusieurs années après l'infection initiale. Le CMV est largement répandu à travers le monde et s'il est bien toléré par les individus sains, il
10 est associé à des pathologies aux conséquences souvent dramatiques pour le fœtus et les immunodéprimés (greffés, sida, cancer) (pour revue voir (1)).

A la suite d'une primo-infection en cours de grossesse, la transmission verticale du virus au fœtus par voie trans placentaire est
15 source de complications chez le nouveau né. Ce sont en particulier des troubles sensoriels (vision, audition) et des retards mentaux importants survenant au cours des premières années de la vie. L'infection par le CMV est associée au rejet du greffon chez les transplantés (allogreffes de moelle, de rein, de cœur, de foie). Elle représente une des infections
20 opportunistes les plus dramatiques chez les individus HIV+ qui, malgré une chimiothérapie par des antiviraux, sont victimes de pathologies souvent mortelles. Pour toutes ces raisons l'infection par le CMV soulève un problème de santé publique important.

L'utilisation d'antiviraux non spécifiques comme Ganciclovir* et
25 Foscarnet* pendant la greffe pose des problèmes de cytotoxicité. Les effets secondaires imposent souvent la diminution des doses ou l'arrêt du traitement, ce qui expose au risque de reprise des troubles associés à l'infection virale. L'injection intraveineuse à haute dose d'immunoglobulines a permis dans certains cas une réduction de la
30 fréquence des pneumopathies et des rejets. Des tentatives d'immunothérapie adoptive ont été développées en injectant à des receveurs de moelle des clones de cellules T cytotoxiques spécifiques de CMV (2). La lourdeur de ces traitements soulève le problème de leur utilisation systématique et de leur coût élevé.

35

La mise au point d'un vaccin sous unitaire aurait une importance capitale pour les futures mères. En effet il a été montré que l'immunité maternelle acquise avant la conception pouvait protéger les nouveau-nés contre les méfaits d'une infection congénitale (3). Le développement d'une immunité anti CMV chez les transplantés serait un facteur important contre le développement des maladies associées à l'infection. Des essais de vaccination avec du virus atténué de la souche de Towne ont été effectués et sont en cours chez des volontaires séronégatifs et des greffés séronégatifs ayant reçu un greffon de donneurs séropositifs (4). Dans la majorité des cas, la vaccination a réduit la sévérité des maladies associées à la réplication du virus. Dans la mesure où l'activité pathogène de tels vaccins n'a pas été définitivement exclue, et où l'utilisation de vaccins vivants peut provoquer des réactions secondaires graves chez des individus immunodéficients, de nouvelles approches utilisant des protéines virales recombinantes en présence d'adjuvants sont en cours de développement.

L'importance pour la santé publique du développement d'un vaccin anti CMV n'est plus à démontrer devant le problème posé par l'infection congénitale jusque là sous estimée par la communauté médicale.

Les économies réalisées en élaborant une politique de prévention des maladies liées à l'infection par le CMV chez les individus à risque seraient substantielles. En effet, des estimations du coût associé à la vaccination d'un individu et à sa prise en charge (analyses sérologiques, vaccin, traitement d'effets secondaires mineurs) montrent qu'il serait environ 50 fois inférieur à celui des soins apportés à un nouveau né victime d'une infection congénitale. L'infection à CMV est observée chez les 2/3 des transplantés rénaux et à une fréquence élevée chez les autres transplantés. Si l'on considère que l'infection est associée à des complications chez environ 1/3 d'entre eux, le coût annuel ajouté à celui de la transplantation est considérable. Malgré l'impact de drogues comme le Ganciclovir*, l'injection de gammaglobulines ou le transfert de clones T anti CMV sur la maladie, la prévention de l'infection primaire et de la réactivation chez ces patients doit être une priorité. Les bénéfices de l'immunisation sont évidents autant sur le plan clinique qu'économique.

La Demanderesse a maintenant trouvé que l'association de la protéine pp65 du CMV, ou de l'un de ses fragments, avec un autre haptène ou antigène du CMV permet de potentialiser la réaction immunogène vis-à-vis de ce virus, notamment en stimulant les compartiments T CD4+ et CD8+ contre le virus.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet une protéine de fusion, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins une partie de la protéine pp65 du cytomégalovirus (ou CMV), ou d'une protéine présentant au moins 80% d'homologie avec la protéine pp65, en association avec au moins un second fragment peptidique dérivé du CMV.

La protéine pp65 est une protéine de matrice du CMV, qui est internalisée dans les cellules et délivrée dans le cytosol en même temps que le virion, très peu de temps après l'infection.

Elle peut être utilisée entière ou sous forme d'un ou plusieurs fragments ; les fragments peptidiques entrant dans la protéine chimère ont de préférence une longueur supérieure ou égale à 9 acides aminés, et couvrent différentes restrictions HLA de classe I. La Demanderesse a montré qu'un peptide de la protéine pp65 d'une longueur supérieure à 9 acides aminés peut être internalisé par une cellule présentatrice et présenté par une molécule du CMH de classe I à une lignée TCD8+ spécifique. L'intérêt de constructions incluant ces peptides et la protéine IE1 en vaccination serait lié à l'utilisation d'antigènes capables d'entrer dans la cellule présentatrice par une voie unique d'endocytose et d'induire à la fois une réponse TCD4+ et TCD8+.

De préférence le second fragment peptidique présent dans la protéine de fusion est constitué par la protéine IE1 ou l'un de ses épitopes, ou par une protéine présentant au moins 80% d'homologie.

En effet, la séquence polypeptidique de IE1, protéine de régulation majeure du cycle viral est très conservée entre les différentes souches virales. L'introduction de cette protéine dans un vaccin sous unitaire permettrait l'induction de cellules TCD4+ auxiliaires mémoires capables de coopérer à l'induction de cellules TCD8+ cytotoxiques anti-pp65 et à la production d'anticorps contre la protéine d'enveloppe gB, soumise à une plus grande variabilité ("cross help"). En effet, il a été montré que la majorité des anticorps neutralisants présents dans le sérum des individus

infectés étaient dirigés contre la glycoprotéine d'enveloppe virale gB (UL55). Pour cette raison, la protéine gB a été considérée comme un des antigènes viraux les plus importants pour la vaccination. De nombreux protocoles utilisant des virus recombinants (Adénovirus, Vaccine, 5 Canaripox...) ont été développés (5, 6, 7).

Les problèmes posés par ces vaccins sont liés soit au caractère pathogène des virus vivants, soit au fait qu'ils induisent des taux d'anticorps trop faibles. Une alternative est l'utilisation d'antigènes recombinants associés à des adjuvants. L'association de la glycoprotéine gB 10 à la protéine chimère IE1-pp65 dans une structure permettant le maintien de sa conformation, indispensable à son immunogénicité, offrirait un moyen de stimuler les compartiments T et B de la réponse anti virale. De plus, l'activation des cellules TCD4+ anti-IE1, médiée par la reconnaissance des peptides IE1 associés aux molécules du CMH de classe II, pourrait 15 permettre de contrôler la réplication du virus dans les cellules voisines soumises à l'effet de l'IFN γ et du TNF α (8). Ces hypothèses ne sont bien entendu aucunement destinées à limiter la portée de l'invention.

On peut notamment utiliser le fragment e4 de la protéine IE1 du CMV, ou un fragment peptidique présentant au moins 80% d'homologie 20 avec ledit fragment e4. e4 ou exon 4, qui comprend 406 acides aminés est un fragment de la protéine IE1, qui comporte 491 acides aminés.

Selon un autre aspect avantageux de l'invention, la protéine de fusion comprend a) le fragment délimité par les résidus d'acides aminés 162 et 175 de la séquence de la protéine IE1 ou,

25 b) un fragment peptidique présentant au moins 90% d'homologie avec ledit fragment mentionné en a).

D'autres épitopes conviennent à la mise en oeuvre de l'invention, tels ceux mentionnés par Davignon et al (8).

La protéine de fusion selon l'invention peut contenir en outre un 30 fragment peptidique dérivé d'un microorganisme différent du CMV, et/ou tout fragment polypeptidique permettant sa purification ultérieure du type des séquences "Tag"; ces séquences placées en amont ou en aval de la protéine d'intérêt permettent de la purifier ou de la marquer ; on peut citer à titre d'exemples l'utilisation de β -galactosidase, d'hexamères 35 d'Histidine (His₆...), ou de GST. Selon un mode de réalisation préféré, la

protéine de fusion comporte un fragment peptidique dérivé d'une enzyme à activité glutathion-S-transférase (ou GST).

La protéine GST facilitera notamment la purification de la protéine de fusion à partir d'un milieu de culture complexe.

5 L'invention a ainsi pour objet une protéine chimère GST-IE1-pp65 de 145 kDa, qui peut être produite dans E. coli. Son immunogénicité a été mise en évidence in vitro, par la prolifération de clones de cellules TCD4+ spécifiques de IE1 et par la lyse de cellules cibles incubées en présence d'une lignée TCD8+ spécifiques de pp65. La Demanderesse a montré que la
10 protéine sous forme soluble et ses fragments, permettaient de stimuler in vitro les compartiments TCD4+ et TCD8+ de la réponse cellulaire spécifique. Ces résultats font de cette protéine un réactif de choix pour la conception d'un vaccin sous unitaire.

15 Les séquences nucléotidiques codant pour une protéine de fusion telle que définie ci-dessus sont également comprises dans l'invention.

Les protéines de fusion et les séquences nucléotidiques correspondantes sont utiles à titre de médicament, et peuvent plus particulièrement être utilisées pour la préparation d'un vaccin destiné à prévenir les infections provoquées par le CMV. Un tel vaccin sera
20 susceptible d'induire une réponse efficace contre une infection primaire avant que le virus ne se soit répliqué activement.

Selon un autre de ses aspects, l'invention a pour objet une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient

25 a) au moins une partie de la protéine pp65 du CMV, ou d'une protéine présentant au moins 80% d'homologie avec la protéine pp65, en association avec au moins un second fragment peptidique dérivé du CMV, ou

b) des séquences nucléotidiques codant pour les peptides mentionnés en a).

30 Outre les excipients de formulation connus de l'homme du métier, tels que stabilisants, conservateurs, anti-oxydants, et adaptés à la voie d'administration, en particulier la voie injectable, les compositions pourront contenir des adjuvants d'immunité. Elles peuvent également contenir d'autres épitopes du CMV. Enfin elles peuvent être formulées
35 avec des systèmes améliorant le transport et la présentation des molécules aux cellules cibles.

Les protéines pourront être sous forme de plusieurs protéines distinctes dans la composition ; elles pourront également être sous forme d'une protéine de fusion telle que décrite précédemment ; il en est de même pour les séquences nucléotidiques correspondantes.

- 5 La composition peut contenir en outre d'autres épitopes en particulier des antigènes d'enveloppe du CMV, comme la protéine gB.

Selon encore un autre aspect, l'invention a pour objet un procédé de préparation d'une protéine de fusion, caractérisé en ce qu'on procède aux étapes suivantes :

- 10 a) on lie une première séquence d'ADN codant pour au moins une partie de la protéine pp65 du CMV avec une seconde séquence d'ADN codant pour un autre polypeptide ou protéine dérivé du CMV de manière à obtenir une séquence d'ADN recombinant codant pour une protéine de fusion,
- 15 b) on introduit la séquence d'ADN recombinant dans une construction contenant les éléments nécessaires à son expression, et éventuellement des séquences codant pour d'autres polypeptides,
- c) on introduit la construction obtenue en b) dans des cellules hôtes qui sont ensuite mises en culture dans des conditions dans lesquelles le
- 20 système d'expression de l'ADN de fusion est fonctionnel, de manière à ce que la protéine de fusion soit produite dans la cellule hôte,
- d) on récupère la protéine de fusion produite dans la cellule hôte et on la purifie.

- La cellule hôte contenant une séquence nucléotidique codant pour
- 25 une protéine de fusion, susceptible d'être obtenue dans le procédé décrit ci-dessus est également comprise dans l'invention. Cette cellule hôte peut notamment être choisie dans le groupe constitué par les bactéries, les virus, les levures et les cellules d'eucaryotes, notamment d'eucaryotes supérieurs.

- 30 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent.

Dans ces exemples on se référera aux figures qui suivent :

Figure 1 : Analyse en Western Blot de l'expression de la protéine GST-IE1-pp65.

Des lysats de bactéries transformées avec les plasmides pGEX 2TK (1) et pGEX 2TK/IE1-pp65 (2, 2') ont été soumis à une SDS-PAGE puis à Western Blot révélé par des anticorps anti-GST (A), anti-IE1 (B) et anti-pp65 (C). Des marqueurs de masses moléculaires (M) précolorés (Gibco) ont été utilisés.

Figure 2 : La protéine GST-IE1-pp65 induit une prolifération spécifique du clone TCD4+ BeA3G9 en présence de PBMC.

Les cellules du clone BeA3G9 ont été incubées en présence de PBMC irradiées de phénotype HLA-DR8 et d'antigène GST ou GST-IE1-pp65. La prolifération des cellules du clone a été déterminée par l'incorporation de [³H]-thymidine, mesurée en cpm.

Figure 3 : La lignée TCD8+ anti-pp65 <<Val>> lyse des cellules d'astrocytome U373MG infectées par CMV Towne.

La lignée TCD8+ <<Val>> générée avec le peptide N9V de pp65 a été utilisée dans un test de relargage de ⁵¹Cr en présence de cellules U373MG soit incubées avec le peptide N9V, soit avec le peptide I9Y, soit infectées par CMV Towne (5moi) pendant 4h puis incubation avec le peptide I9Y. Le pourcentage de lyse spécifique a été calculé comme indiqué dans Matériels et Méthodes.

Figure 4 : Représentation schématique des protéines recombinantes produites dans E. coli.

Les séquences peptidiques correspondant aux épitopes présentés par HLA-DR8, HLA-A2 et HLA-B35 et leurs localisations sont représentées.

Figure 5 : La lignée TCD8+ anti-pp65 <<Val>> lyse des cellules B/EBV incubées en présence de la protéine GST-IE1-pp65 prétraitée à la trypsine.

Les cellules de la lignée <<Val>> ont été utilisées dans un test de relargage de ⁵¹Cr en présence de lymphocytes B/EBV autologues prétraités ou non avec la chloroquine (Matériels et Méthodes) et les peptides et protéines comme indiqué.

Figure 6 : Analyse de la production de la protéine His₆-IE1-pp65 par des cellules d'insectes infectées par un Baculovirus recombinant.

Des cellules d'insectes Sf9 ont été infectées avec des Baculovirus recombinants IE1-pp65 pendant 48 h. Les lysats cellulaires (1) ont été centrifugés, le surnageant (2) passé sur une colonne Ni-Agarose et les éluats récupérés (3,4). Les différentes fractions ont été soumises à un SDS-PAGE et colorées au bleu de Coomassie.

Exemple 1: Production de la protéine de fusion dans des bactéries DH5 α

Matériels et Méthodes

I-Clonage des ADNc de IE1 et pp65 dans pGEX 2TK

I-1 Préparation des ADNc IE1 et pp65

I-1-1 ADNc-IE1

La région du génome viral contenant la séquence codant pour la protéine IE1 située dans le fragment C-Hind III de la souche CMV-Towne a été cloné dans un plasmide nommé pRL103. Ce plasmide a été utilisé pour transfecter des cellules de la lignée astrocytaire U373 MG (désignée A2 (don de R. Lafemina, Merck Sharp and Dohme, WestPoint, PA, USA). Ces cellules ont été cultivées dans du RPMI-SVF (RPMI 1640 Glutamax, 1 mM pyruvate de sodium, 200 u/ml pénicilline, 100 μ g/ml streptomycine, 10% sérum de veau décomplémenté) jusqu'à confluence. L'ARN total d'une culture de 3 jours a été préparé selon la technique de Chomzynski et Sacchi (14). L'ADNc de IE1 a été généré par RT-PCR (Kit Super Script, GIBCO BRL) sur un aliquot de 5 μ g d'ARN total selon les indications du fournisseur avec les amorces C1: GATCCGGATCCATGGAGTCCTCTGCCAAGAGA et C2 : CCCGGGGAATTCCTGGTCAGCCTTGCTTCTAGT. Des sites BamHI et EcoRI ont été introduits dans les amorces C1 (extrémité 5' de IE1) et C2 (extrémité 3' de IE1) respectivement. Le produit de PCR ainsi obtenu (1480 pb) a été purifié sur colonne S400-HR (PHARMACIA).

I-1-2 ADNc-pp65

Les cellules d'une lignée fibroblastique humaine (MRC5, Mérieux) cultivées en BME supplémenté par 10% de sérum de veau foetal (BME/SVF) ont été infectées par le CMV (souche Towne). Dès l'apparition d'un effet cytopathique, le surnageant contenant le virus a été récupéré et inactivé par la chaleur (60°C, 30 mn). Les particules virales ont été récoltées par centrifugation (31000g, 4°C, 90 mn) et les capsides ont été dégradées par un traitement avec la protéinase K (BOEHRINGER) (150 µg) dans 250 µl de tampon de lyse (10 mM TrisCl pH 7.5, 1mM EDTA, 2% sarcosyl) pendant 30 mn à température ambiante. L'ADN viral a été extrait au phénol/chloroforme puis précipité par l'éthanol absolu. Le culot d'ADN a été séché et solubilisé dans 20 µl d'eau. Un fragment correspondant à l'ADNc de pp65 a été obtenu par PCR sur un aliquot de 2 µl d'ADN viral en utilisant les amorces C3: CCCGGGGAATTCATGGCATCCGTACTGGGTCCC et C4: GAATTCGGATCCTCAACCTCGGTGCTrmGG complémentaires des extrémités 5' et 3' du gène de pp65 et contenant respectivement les sites EcoRI et BamHI. Le produit de PCR (1670 pb) a été purifié sur colonne S400-HR (PHARMACIA).

I-2 Construction du plasmide pGEX 2TK-IE1-pp65

1-2-1 Purification des fragments IE1 et pp65 digérés par BamHI et EcoRI

Les fragments d'ADNc de IE1 et pp65 ont été préalablement clonés dans les sites BamHI et EcoRI d'un plasmide pUC18. Des bactéries compétentes DH5α (GIBCO) ont été transformées par 5 à 10 ng de ligation IE1/pUC18 ou pp65/pUC18. Les plasmides recombinants ont été digérés par BamHI et EcoRI. Les produits de digestion ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et extraits du gel avec le kit "JetSorb/150" (GENOMED).

1-2-2 Purification du fragment IE1-pp65

Une quantité identique des fragments IE1 et pp65 digérés par BamHI et EcoRI a été incubée en présence de T4 DNA Ligase. Le mélange réactionnel a été soumis à une digestion par BamHI. Les fragments obtenus pp65-pp65 (3340 pb), IE1-pp65 (3150 pb) IE1-IE1 (2960 pb) ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le fragment IE1-pp65 a été extrait du gel avec le kit "JetSorb/150" (GENOMED).

1-2-3 Clonage de IE1-pp65 dans pGEX 2TK

Le fragment IE1-pp65 a été inséré dans le site BamHI du plasmide pGEX 2TK (PHARMACIA). Les clones de bactéries recombinantes ont été conservés à -80°C dans du PBS, 3.5% DMSO jusqu'à leur utilisation pour la purification de la protéine.

II-Production de la protéine de fusion GST-IE1-pp65

Un aliquot de bactéries congelées à -80°C a été remis en suspension dans 5ml de milieu LB contenant de l'ampicilline (Ap, 50 µg/ml) et mis en culture pendant 8 heures à 37°C. La culture, diluée dans 45 ml du même milieu a été poursuivie pendant 15 heures, reprise dans 500 ml de LB+Ap jusqu'à une densité optique ($\lambda=600$ nm) de 1. La production de GST-IE1-pp65 a été induite par l'ajout d'IPTG (100 µM) dans le milieu de culture. Les bactéries ont été récoltées par centrifugation après 3 heures de culture à température ambiante et conservées à - 80°C.

La lyse des bactéries et la purification de la protéine recombinante par chromatographie d'affinité sur une colonne "Sepharose 4-B" greffée avec du Glutathion (PHARMACIA) ont été effectués selon les indications du fournisseur.

Le degré de pureté de la protéine a été contrôlé en SDS-PAGE suivi d'une coloration au bleu de Coomassie. L'antigénicité de GST-IE1-pp65 a été analysée en western-blot en utilisant des anticorps de chèvre dirigés contre GST (PHARMACIA, dilution 1/400), et des anticorps de souris dirigés contre IE1 (surnageant E13 dilué au 1/10, don du Dr.Mazeron, Hal Lariboisière, Paris) et pp65 (NEA 20 dilué au 1/250, DUPONT). Des anticorps secondaires couplés à la peroxydase RAG/PO, RAM/PO (Nordic) ont été utilisés au 1/500. Les protéines ont été dosées selon la méthode de Bradford avec le kit "Bio-Rad Protein Assay" (BIORAD). La protéine recombinante GST a été produite et purifiée.

Résultats et discussion

Purification de GST-IE1-pp65

Nous avons obtenu en moyenne 1 mg de protéine GST-IE1-pp65 purifiée par chromatographie-glutathion à partir d'une culture de 500 ml de DH5 α /pGEX 2TK-IE1-pp65. L'analyse en électrophorèse en conditions dénaturantes suivie d'un western blot avec les anticorps anti-GST, anti-IE1 et anti-pp65 effectuée à partir de lysats de bactéries recombinantes est montrée sur la figure 1. Un produit correspondant à une masse théorique de 145 kDa était révélé par les trois anticorps dans les échantillons préparés à partir des bactéries recombinantes. Les bandes de masses moléculaires inférieures reconnues par les anticorps sont des produits de dégradation de la protéine. Ces résultats sont en accord avec la production dans ces bactéries d'une protéine résultant de la fusion GST-IE1-pp65 (Figure 4). La protéolyse de la protéine par la trypsine a été analysée en SDS-PAGE et montre la disparition de la bande de migration correspondant à la protéine entière corrélée avec l'apparition d'une bande de faible poids moléculaire correspondant à la génération de peptides. Parmi ces fragments, et d'après l'analyse de la séquence de la protéine figure un peptide de 15 aa contenant le peptide N9V (voir "Matériels et Méthodes" et Figure 4).

Exemple 2

Matériels et méthodes

I-Test de lymphoprolifération

Des cellules (2×10^4) d'un clone T CD4+ (BeA3G9) restreint par HLA DR8 et spécifique d'un épitope situé à la position 162-175 de la protéine IE1 ont été incubées dans 100 μ l de milieu RPMI-SH avec des cellules présentatrices d'antigène (1×10^5 PBMC) irradiées (2500 rads) de même phénotype HLA-DR. Ces cellules ont été incubées avec une gamme de dilution de la protéine recombinante. Au jour 3, 1 μ Ci de [3 H]-thymidine (AMERSHAM) par puits a été ajouté à la culture. Quinze heures plus tard, l'ADN cellulaire a été recueilli sur des filtres en fibre de verre (PACKARD)

et l'incorporation de [^3H]-thymidine mesurée dans un compteur β à gaz Matrix 9600 (PACKARD). Chaque mesure a été réalisée en triple.

II-Génération d'une lignée T CD8⁺ spécifique d'un peptide de la protéine pp65

Des leucocytes du sang périphérique de donneurs séropositifs pour le CMV ($2 \times 10^6/\text{ml}$) d'haplotype HLA-A2 ont été mis en culture dans des plaques 24 puits en RPMI-SH (2 ml). 100 U/ml de "Lymphocult-T-LF" (BIOTEST, France) ont été ajoutés à J+3. A J+7, les cellules vivantes ont été récupérées dans l'anneau d'un gradient de ficoll. Ces cellules ($5 \times 10^5/\text{puits}$) ont été incubées en présence de cellules stimulatrices autologues ($1.5 \times 10^6/\text{puits}$) en RPMI-SH (2 ml) supplémenté par 10% de «Lymphocult». Les cellules stimulatrices (10×10^6 cellules/ml) ont été incubées dans du RPMI en présence de 30 μg d'un peptide présenté par HLA-A2 (peptide N9V, Figure 5, Néosystem, France) pendant 1 heure à 37°C et ont été irradiées (2500 rads). Les cellules effectrices ont été restimulées dans les mêmes conditions tous les 7 jours. La cytotoxicité de la lignée «Val» ainsi obtenue a été testée au jour 14. Le phénotype CD8⁺ de la lignée a été déterminé par cytofluorimétrie avec l'anticorps monoclonal de souris OKT8.

III-Test de cytotoxicité

III-1 Dans le contexte de l'infection par le CMV

Des cellules d'astrocytome U373MG d'haplotype HLA-A2 (2×10^5) à 80% de confluence en RPMI/SVF ont été infectées par le virus CMV-Towne à raison de 5 pfu/cellule dans des plaques à 6 puits (10 cm²). Après 4h d'infection les cellules ont été marquées avec 100 μCi de $\text{Na}_2 \text{ } ^{51}\text{CrO}_4$ (ICN, France) et lavées en RPMI. Les cellules effectrices autologues de la lignée TCD8⁺ ont été incubées avec 10^4 cellules cibles dans du RPMI/10% SVF (500 μl) pendant 4 heures à 37°C. Des quantités variables de cellules effectrices

ont été ajoutées aux cibles de façon à obtenir différents rapports effecteur/cible. Alternativement, les cellules ont été préincubées toute la nuit à 37°C avec soit le peptide N9V soit un peptide reconnu par HLA-B35 (peptide I9Y, Figure 4, Néosystem, France) à une concentration finale de 100nM.

Le taux de relarguage spontané a été déterminé par la mesure de la radioactivité libérée par des cellules cibles maintenues en culture pendant 4 heures. Le pourcentage de lyse spécifique a été calculé en utilisant la formule suivante $\left(\frac{\text{radioactivité mesurée} - \text{relarguage spontané}}{\text{radioactivité totale} - \text{relarguage spontané}} \times 100 \right)$. La radioactivité est mesurée sur un compteur γ Cobra (PACKARD). Chaque mesure est réalisée en double.

III-2 En présence de la protéine GST-IEI-pp65 native ou digérée par la trypsine, avec ou sans chloroquine

La protéine purifiée GST-IEI-pp65 a été désalée par ultrafiltration centrifuge avec des unités de filtration "Centricon 10" (FILTRON), lyophilisée et reprise dans l'eau avant d'être utilisée sous cette forme ou digérée par la trypsine (TCPK, SIGMA, 200 ng pour 900 μ g de protéine) dans un volume de 100 μ l de tampon Tris [100 mM tris-HCl pH 8.0] pendant 2 heures à 37° C. Des aliquots prélevés avant et après digestion ont été analysés en SDS-PAGE.

Des lymphocytes B-EBV autologues (1×10^6) préalablement lavés et irradiés (10^4 rads) ont été préincubés soit avec les antigènes (1 μ M) pendant 15 heures à 37°C en milieu RPMI-SVF (0.5 ml) en plaque 48 puits soit dans du RPMI-SVF 5% / chloroquine 80 μ M (SIGMA) pendant 30 mn avant l'ajout des antigènes. Alternativement, les cellules ont été préincubées toute la nuit à 37° C avec soit le peptide N9V soit le peptide I9Y à une concentration finale de 10 nM. Au terme de cette incubation, les cellules (50000/ml) ont été marquées avec 100 μ Ci de $\text{Na}_2 \text{}^{51}\text{CrO}_4$ et lavées en RPMI. Les cellules effectrices de la lignée TCD8+ ont été ajoutées dans les mêmes conditions que pour les cellules d'astrocytomes.

Résultats et discussion

I-Lymphoprolifération du clone T CD4⁺ BeA3G9 en présence de GSTIE1-pp65

- 5 La figure 2 montre les résultats de la prolifération du clone BeA3G9 anti-IE1 en présence de PBMC incubées avec l'antigène recombinant purifié GST-IE1-pp65. Le clone proliférait spécifiquement puisque en présence de la protéine GST aucune incorporation de thymidine n'avait été observée. Cette prolifération était du même ordre que celle obtenue avec la
- 10 protéine de fusion GST-e4 (80% C-terminal d'IE1) ou GST-IE1. Ces résultats montrent que la protéine GST-IE1-pp65 a été correctement apprêtée par les cellules présentatrices d'antigène HLA-DR8 de manière à présenter un épitope de IE1 reconnu par les cellules du clone BeA3G9.

- 15 II-Les cellules TCD8⁺ anti-pp65 de la lignée «Val» lysent des cibles incubées en présence de la protéine GST-IE1-pp65 dirigée par la trypsine

- 20 II-1 La lignée «Val» reconnaît un peptide naturel généré après infection par le CMV

- La figure 3 montre les résultats d'un test de cytotoxicité effectué dans le contexte de l'infection de cellules d'astrocytome U373MG de phénotype HLA-A2. Une lyse spécifique des cibles a été observée en présence du peptide N9V (HLA-A2) alors qu'elle est pratiquement nulle
- 25 avec le peptide I9Y (HLA-B35), ce qui montre que les molécules du CMH de classe I de phénotype A2 à la surface des cellules U373MG sont chargées spécifiquement avec le peptide N9V. Lorsque ces cellules ont été infectées par le CMV, une lyse spécifique d'un niveau équivalent à celui obtenu avec le peptide N9V était observée. Ceci suggère que la protéine pp65 apportée
- 30 par l'inoculum a été délivrée dans le cytosol et apprêtée de telle sorte qu'un peptide identique ou de structure proche de N9V a été généré et présenté spécifiquement aux cellules de la lignée «Val».

II-2 Des lymphocytes B/EBV incubés en présence de la protéine GST-IE1-pp65 digérée par la trypsine sont lysés par la lignée anti-pp65 «Val» : effet du traitement des cellules à la chloroquine

- 5 Les résultats d'une expérience dans laquelle la protéine GST-IE1-pp65 ne sensibilisait pas les cibles à la lyse par la lignée «Val» contrairement à un échantillon de cette même fraction prédigéré par la trypsine sont montrés sur la figure 5. Lorsque les cellules étaient prétraitées à la chloroquine et incubées en présence de la protéine
- 10 digérée par la trypsine les cibles n'étaient pas lysées. Une digestion de la protéine par la trypsine génère un peptide de 15 aa, N15K, contenant le peptide N9V (Figure 4). La mise en évidence d'une lyse des cibles en présence de cet hydrolysate suggère que le peptide N15K est présenté à la lignée «Val». De plus, le prétraitement des cellules à la chloroquine
- 15 montre que ce peptide a été internalisé par les cellules et apprêté dans un compartiment de type endo-lysosome sensible à une augmentation de pH.

Exemple 3

20 Matériels et méthodes

Clonage de IE1-pp65 dans le vecteur d'expression "Baculovirus" pAChLT-B. Cotransfection de cellules d'insectes Sf9 avec le plasmide recombinant et l'ADN de Baculovirus:

- 25 Le fragment IE1-pp65 purifié (exemple 1, §1-2-2) a été inséré au site BglII du plasmide pAChLT-B (PharMingen) contenant une séquence codant pour un peptide de 6 résidus histidine (His₆). Les plasmides recombinants ont été caractérisés et purifiés. Des cellules d'insectes Sf9 (ATCC CRL1711) ont été incubées pendant 4h à 37° C en présence d'un
- 30 mélange contenant 3 µg de plasmide et 0,5 µg d'ADN viral selon le protocole proposé par PharMingen. Après 5 jours de culture la production de protéine a été analysée par "Western blot" avec les anticorps monoclonaux anti-IE1 (E13, Argenc) et anti-pp65 (NEA20, Biosoft).

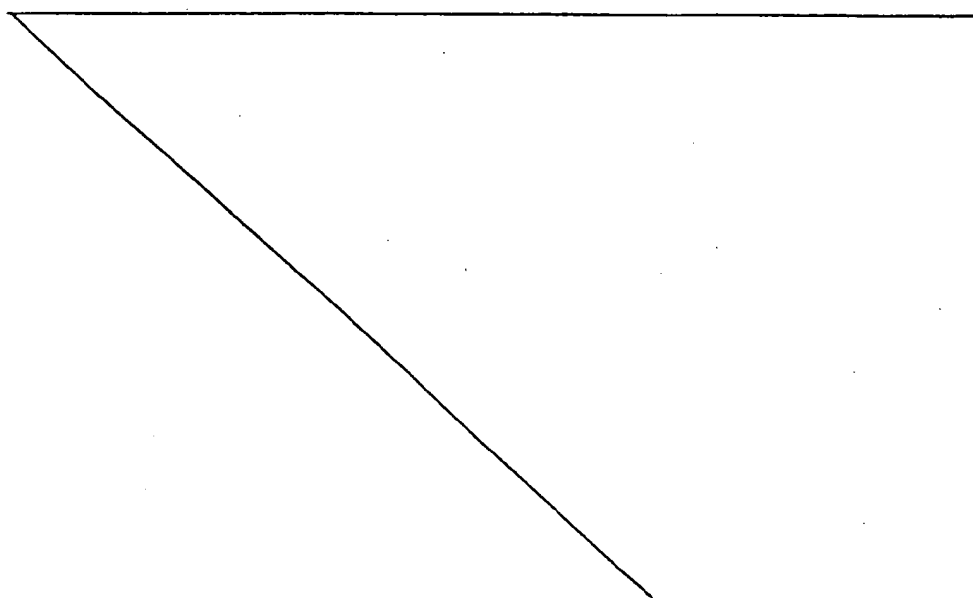
Production et purification de la protéine His₆IE1-pp65

Une cinétique de production de la protéine dans des cellules Sf9 infectées a été réalisée de 0 à 5 jours et analysée en "Western blot". Des lysats de cellules infectées (Tampon de lyse: Tris 10 mM, NaCl 130mM, Triton X-100, NaF 10mM, NaPi 10mM, NaPPi 10mM, pH 7,5, Pharmingen) ont été déposés sur une colonne d'affinité Ni-NTA (Qjagen) et la protéine éluée avec le tampon (NaPO₄ 50mM, NaCl 300mM, Glycérol 10%, Imidazol 0,5M, Pharmingen). Le degré de pureté de la protéine a été contrôlé en SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie.

Résultats

Purification de la protéine His₆IE1-pp65

La figure 6 montre l'analyse en SDS-PAGE de la protéine His₆IE1-pp65 produite par les cellules infectées avec des Baculovirus recombinants et purifiée par chromatographie Ni. Ces résultats montrent que la protéine représente une part importante des protéines cellulaires totales et est obtenue avec un degré de pureté élevé après chromatographie.



REFERENCES

1. Alford C.A., and Britt W.J. (1990) Cytomegalovirus. In: Virology,
5 Second Edition, (ed. B. N.Fields, and D.M. Knipe et al.), Raven Press
Ltd., New York.
2. Riddell, S.R., Watanabe, K.S., Goodrich, J.M., Li, R. C., Agha, M.E.,
Greenberg, P.D. (1992) Restoration of viral immunity in
10 immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones.
Sciences 257: 238-241.
3. Fowler, K. B., Stagno, S., Pass, R.F., Britt, W.J., Boll, T.J., Alford, C.A.
(1992) The outcome of congenital cytomegalovirus infection in
15 relation to maternal antibody status. N Engl J Med 326: 663-66.
4. Plotkin, S., Higgins, R., Kurtz, J.B., Morris, P.J., Campbell, D.A., Shope,
T.C., Spector, S.A., and Dankner, W.M. (1994) Multicenter trial of
Towne strain attenuated virus vaccine in seronegative renal
20 transplant recipients. Transplantation 58: 1176-1178.
5. Cranage, M.P., Kouzarides, T., Bankier, A., Satchxell, S.; Weston, K.,
Tomlinson, P and Barrell, B. Identification of the hyman
Cytomegalovirus glycoprotein B gene and induction of neutralizing
25 antibodies via its expression in recombinant vaccinia virus. EMBO J.
1986, 5: 3057-3063.
6. Marshall, G.S., Ricciardi, R.P., Rando, R.F., Puck, J., Ge, R., Plotkin,
S.A., and Genezol, E. An adenovirus recombinant that express the
30 human cytomegalovirus major envelope glycoprotein and induces
neutralizing antibodies. J. Infect. Dis. 1990, 162 : 1177-1181.

7. Gonczol, E; Berencsi, K., Pincus, S., Endresz; V., Méric, C., Paoletti E, and Plotkin, S. Preclinical evaluation of an ALVAC (canarypox)-human cytomegalovirus glycoprotein B vaccine candidate. *Vaccine*. 1995, 13: 1080-1085.
- 5
8. Davignon J-L, Castanié P., Allan-Yorke J., Gautier N., Clément D., Davrinche C. (1995) Anti-human cytomegalovirus activity of cytokines produced by CD4+ T cell clones specifically activated by IE1 peptides in vitro. *J. Virol* 70, 2162-2169 (1996).
- 10

REVENDICATIONS

5 1. Protéine de fusion, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins une partie de la protéine pp65 du cytomégalo virus (ou CMV), ou d'une protéine présentant au moins 80% d'homologie avec la protéine pp65, en association avec au moins un second fragment peptidique dérivé du CMV.

 2. Protéine de fusion selon la revendication 1, caractérisée en ce
10 que le second fragment peptidique est constitué par la protéine IE1 ou l'un de ses épitopes, ou par une protéine présentant au moins 80% d'homologie.

 3. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que le second fragment peptidique est le fragment e4 de la protéine IE1 du CMV, ou un fragment peptidique présentant au moins
15 80% d'homologie avec ledit fragment e4.

 4. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que le second fragment peptidique est :

a) le fragment délimité par les résidus d'acides-amino 162 et 175 de la séquence de la protéine IE1 ou,
20 b) un fragment peptidique présentant au moins 90% d'homologie avec ledit fragment mentionné en a).

 5. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre un fragment peptidique dérivé d'un microorganisme différent du CMV.

25 6. Protéine de fusion selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle comporte un fragment peptidique dérivé d'une enzyme à activité glutathion-S-transférase (ou GST) ou toute autre séquence "Tag".

 7. Séquence nucléotidique codant pour une protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 6.

30 8. A titre de médicament, protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 6, ou séquence nucléotidique selon la revendication 7.

 9. Utilisation, d'une protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 6 ou d'une séquence nucléotidique selon la revendication 7 pour la préparation d'un vaccin destiné à prévenir les
35 infections provoquées par le CMV.

10. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient
a) au moins une partie de la protéine pp65 du CMV, ou d'une protéine
présentant au moins 80% d'homologie avec la protéine pp65, en
association avec au moins un second fragment peptidique dérivé du
5 CMV, ou

b) des séquences nucléotidiques codant pour les peptides mentionnés en
a).

11. Composition pharmaceutique selon la revendication 10,
caractérisée en ce qu'elle contient une protéine de fusion selon l'une des
10 revendications 1 à 6 ou une séquence nucléotidique selon la revendication
7, avec des excipients pharmaceutiquement acceptables.

12. Composition pharmaceutique selon la revendication 11,
caractérisée en ce qu'elle contient en outre un antigène d'enveloppe du
CMV.

13. Procédé de préparation d'une protéine de fusion selon l'une des
15 revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'on procède aux étapes suivantes :

a) on lie une première séquence d'ADN codant pour au moins une partie
de la protéine pp65 du CMV avec une seconde séquence d'ADN codant
pour un autre polypeptide dérivé du CMV de manière à obtenir une
20 séquence d'ADN recombinant codant pour une protéine de fusion,

b) on introduit la séquence d'ADN recombinant dans une construction
contenant les éléments nécessaires à son expression, et éventuellement
des séquences codant pour d'autres polypeptides, notamment "Tag",

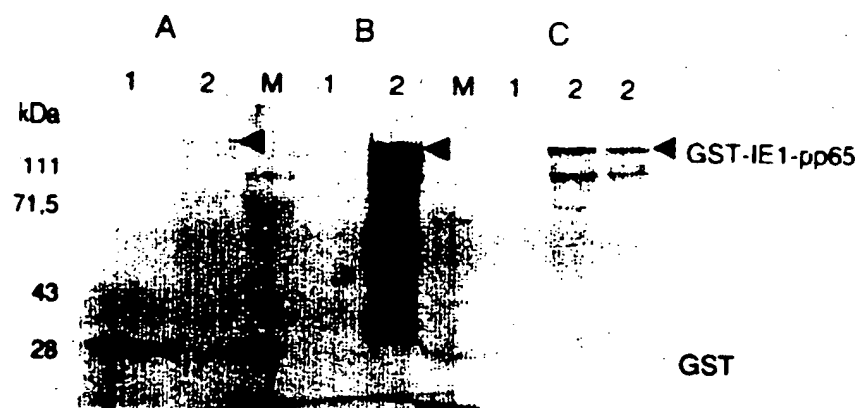
c) on introduit la construction obtenue en b) dans des cellules hôtes qui
25 sont ensuite mises en culture dans des conditions dans lesquelles le
système d'expression de l'ADN de fusion est fonctionnel, de manière à
ce que la protéine de fusion soit produite dans la cellule hôte,

d) on récupère la protéine de fusion produite dans la cellule hôte et on la
purifie.

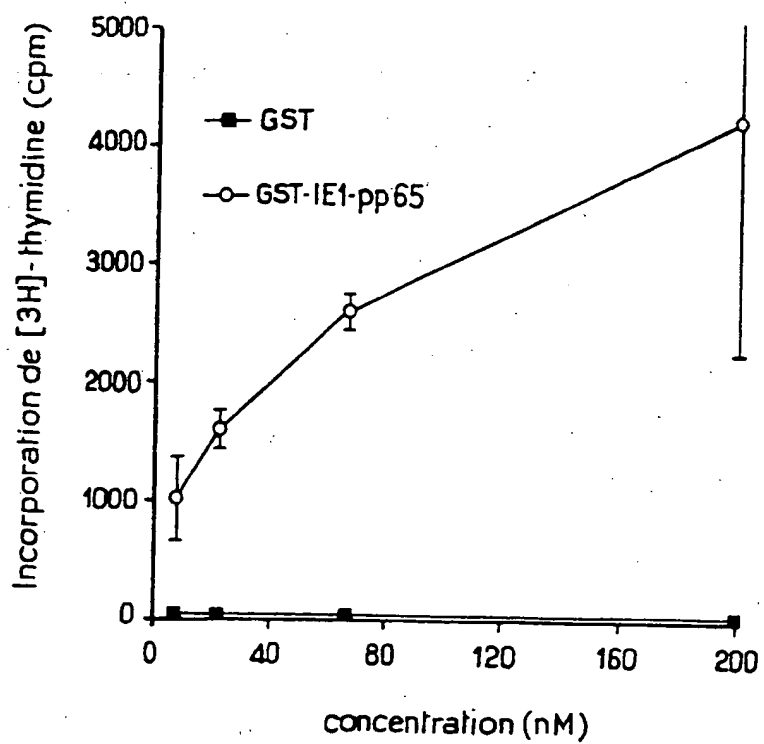
14. Cellule hôte contenant une séquence nucléotidique codant pour
30 une protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 6, susceptible
d'être obtenue dans le procédé selon la revendication 13.

15. Cellule hôte selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle
est choisie dans le groupe constitué par les bactéries, les virus, les levures
35 et les cellules d'eucaryotes.

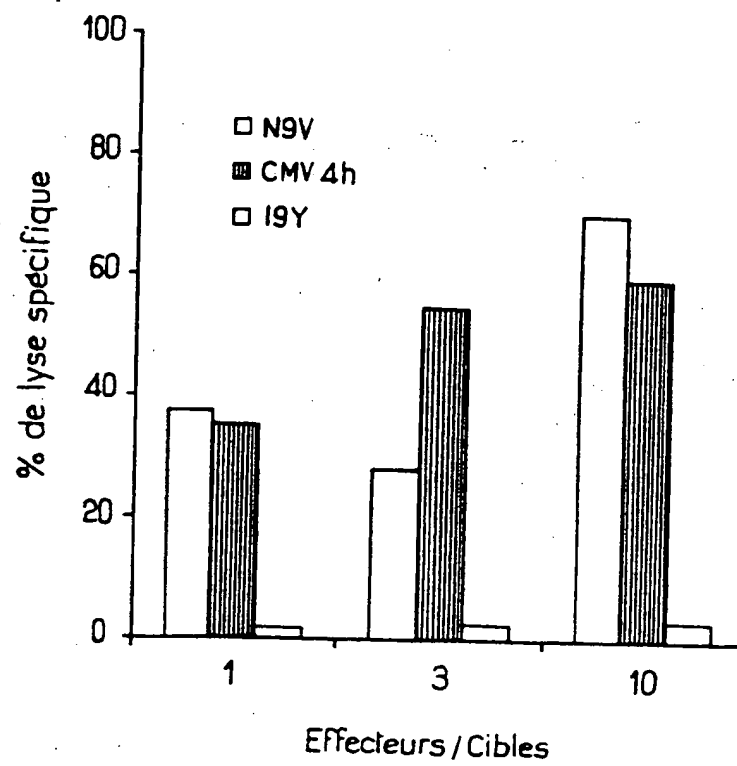
1/6

FIG.1

2 / 6

FIG. 2

3 / 6

FIG. 3

4 / 6

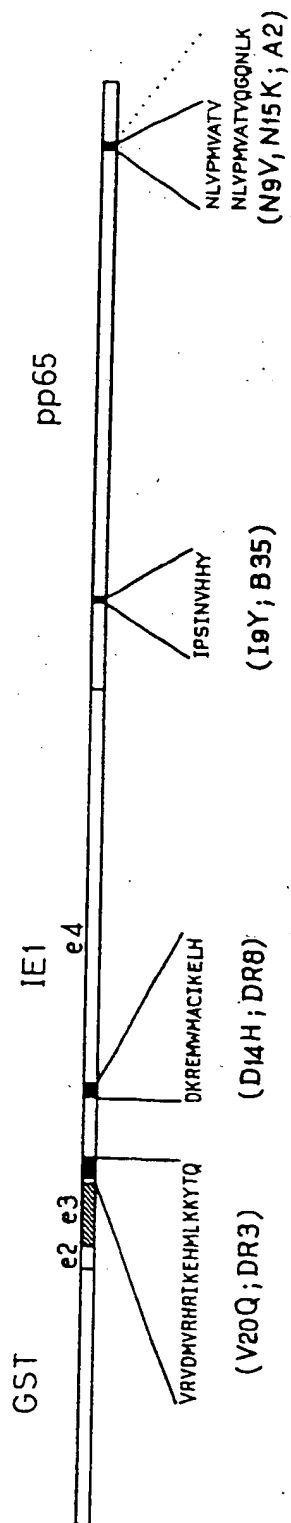
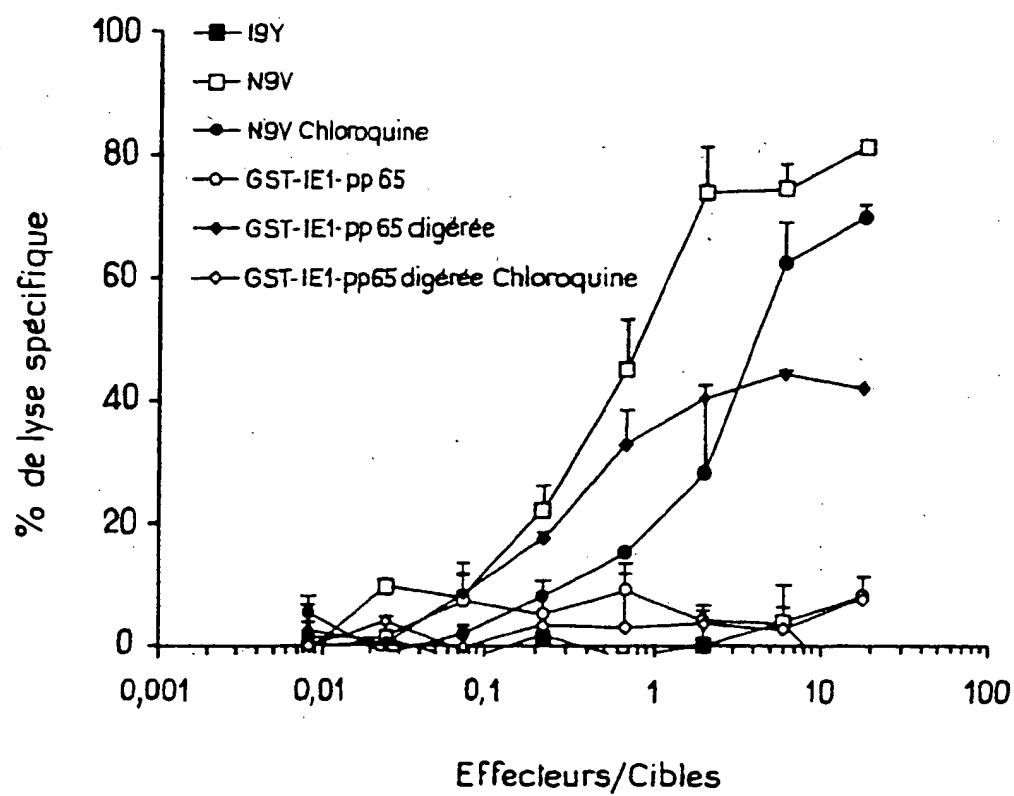
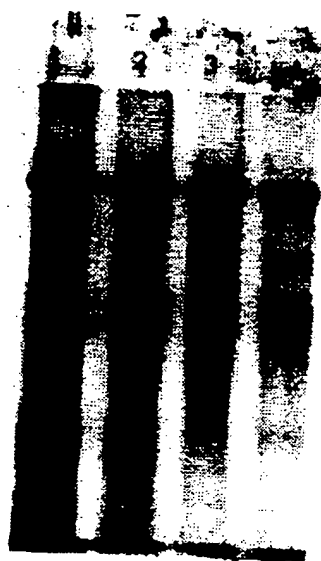


FIG. 4

5 / 6

FIG.5

6/6



His6-IE1-pp65

FIG. 6

2757169

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 536201
FR 9615344

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 96 39491 A (VIROGENETICS CORP) 12 décembre 1996 * page 141, alinéa 4 - page 149, alinéa 1 * * page 171, alinéa 4 - alinéa 5; revendications *	1-4,7,9, 13-15	
X	DE 44 26 453 C (BIOTEST AG) 2 novembre 1995 * colonne 2, ligne 7 - ligne 28; revendications; exemples *	1,7, 13-15	
A	WO 94 00150 A (HOPE CITY ; PANDE HEMA (US); RIGGS ARTHUR D (US); ZAIA JOHN A (US)) 6 janvier 1994 * revendications; exemples *	1,9	
A	WO 96 06638 A (BIOVECTOR THERAPEUTICS SA ; INST NAT SANTE RECH MED (FR); BETBEDER) 7 mars 1996 * revendications; exemples *	1,2,6,9	
A	WO 96 01321 A (ABBOTT LAB ; LANDINI MARIA PAOLA (IT); RIPALTI ALESSANDRO (IT); MAI) 18 janvier 1996 * revendications; exemples *	1	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
			C12N C07K A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
6 octobre 1997		Fuhr, C	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

1
EPO FORM 1503 D3.82 (P04C13)